

(2) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2004年3月18日(18.03.2004)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 2004/022589 A1

(51) 国际分类号: C07K 14/435, C12N 15/12
(21) 国际申请号: PCT/CN2002/000631
(22) 国际申请日: 2002年9月9日(09.09.2002)
(25) 申请语言: 中文
(26) 公布语言: 中文
(71)(72) 发明人/申请人: 吴骏(WU, Jun) [CN/CN]; 中国上海市南丹东路99弄11号305室, Shanghai 200030 (CN).
(72) 发明人: 及
(75) 发明人/申请人(仅对美国): 罗颖(LUO, Ying) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张江高科技园区碧波路573号11座501室, Shanghai 201203 (CN).
(74) 代理人: 上海专利商标事务所(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市桂平路435号徐迅, Shanghai 200233 (CN).

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW
(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: TUMOR TAG AND THE USE THEREOF

(54) 发明名称: 肿瘤标志物及其用途

(57) Abstract: The present invention provides new tumor tag-RL5 proteins, the polynucleotides encoding the RL5 proteins, and to the method of producing the RL5 proteins by recombination technology. The present invention also discloses the use of the RL5 proteins and the polynucleotides encoding them, e.g., diagnosing and treating for tumor. The present invention provides pharmaceutical compositions containing the RL5 protein or the antibody against it.

(57) 摘要

本发明提供了一种新的肿瘤标志物-RL5蛋白, 编码RL5蛋白的多核苷酸和经重组技术产生这种RL5蛋白的方法。本发明还公开了RL5蛋白及其编码序列的用途, 如用于诊断和治疗肿瘤。本发明还提供了含RL5蛋白或其抗体的药物组合物。

WO 2004/022589 A1

BEST AVAILABLE COPY

肿瘤标志物及其用途

技术领域

本发明属于生物技术和医学领域，具体地说，本发明涉及一种新的肿瘤标志物-RL5 蛋白，编码 RL5 蛋白的多核苷酸和经重组技术产生这种 RL5 蛋白的方法。本发明还公开了 RL5 蛋白及其编码序列的用途，如用于诊断和治疗肿瘤，以及含 RL5 蛋白或其抗体的药物组合物。

背景技术

二十世纪 50 年代以来医学科学有了飞跃的发展，癌症治疗的进展也是卓有成效的，并发现了不少直接与癌症发生相关的癌基因与抑癌基因。

早在 40 年前，Lewis Thomas & Macfarlane Burnet 就提出了免疫系统对癌症的发生有监测和抑制的作用。近两三年来关于 NK 细胞和 T 细胞的研究结果为这一假说提供了新的支持证据，并揭示了参与这一过程的可能的分子机制。

NK 细胞(自然杀伤细胞)是免疫的第一道防线。NK 细胞分泌细胞毒素，能够快速地识别、杀死它们的靶细胞。由于 NK 细胞的作用无需抗原或有丝分裂原刺激，亦不依赖抗体或补体，因此它本身应能够分辨异常和正常组织。目前一般认为 NK 细胞的活性是通过表面上抑制性和激活性受体的平衡来调节的。MHC-I 与 NK 细胞表面的受体结合，包括鼠 Ly49(识别 H-2K, H-2D)和人 KIR(Immunoglobulin-like receptor，识别 HLA-A, -B, 或-C)在内，从而抑制它的活性。在病毒感染细胞和肿瘤细胞中，MHC-I 的表达通常被破坏，不能和 NK 细胞表面的抑制性受体结合从而激活 NK 细胞并被其杀死。

除了 NK 细胞之外，T 细胞可阻止致癌因素诱发的皮肤肿瘤的发生。在人类和小鼠中， $\gamma\delta$ -T 细胞受体(T Cell Receptor, TCR)阳性的 T 细胞位于皮肤、消化道上皮组织及粘膜表面，参与局域性免疫。目前的实验结果表明这些 T 细胞在消灭外界致癌剂转化的细胞中也有重要的作用。研究还显示， $\gamma\delta$ -TCR+ T 细胞可阻止肠道上皮肿瘤的发生。两个 MHC-I 相关分子，即 MICA/MICB，被发现可作为细胞异常的信号，引起免疫应答。

Bauer 等人(Bauer S, et al., Science 1999 Jul 30; 285(5428): 727-9)通过代表性差异分析技术(representational difference analysis, RDA)鉴定出 MICA/MICB 的受体 NKG2D，一种在此之前对它的表达和功能均为未知的孤儿 C 型凝集素样 NK 细胞受体(orphan C-type lectin-like NK cell receptor)。

目前已经发现了数个 MHC-I 以及其相关分子特异性的 NK 细胞受体。和其他的 NK 细胞受体不同，NKG2D 是位于所有 NK 细胞、 $\gamma\delta$ -TCR+ T 细胞、CD8+ $\alpha\beta$ -TCR+ T 细胞表面的一种激活性受体，和跨膜转接蛋白 DAP10 相作用(Wu J, et al.,

Science 1999 Jul 30; 285 (5428): 730-2)。DAP10 蛋白的胞质部分含有一个 YxxM 基序, 可激活 PI3 激酶传导途径。

小鼠中并没有人类 MICA/B 同源基因。然而, 在小鼠中发现另一个被称为 RAE-1 的糖蛋白家族(Cerwenka A, et al., Immunity 2000 Jun; 12 (6): 721-7), 同样作为 NKG2D 的配体而作用, 表现出与 MHC-I 较弱的同源。目前为止, 已经发现了 5 种小鼠 RAE-1 异型蛋白(RAE-1- α 、- β 、- γ 、- δ 、- ϵ)和一个相关蛋白, H60。表达分析显示 RAE-1 基因在正常的成体组织中不表达或表达很低, 在一些肿瘤组织构成性的表达, 其表达量在维甲酸(retinoic acid)的作用下提高。在正常皮肤中没有 RAE-1 的表达, 经致癌剂 TPA 诱导后在小鼠的肿瘤中表达。近来 Diefenbach 等(Diefenbach A, et al., Nature 2001 Sep 13; 413 (6852): 165-71)和 Cerwenka 等人(Cerwenka A, et al., Proc Natl Acad Sci USA 2001 Sep 25; 98 (20): 11521-6)的研究显示, 在表达 MHC Class I 的肿瘤中, 如果同时表达 RAE-1, 该肿瘤也能在体外被 NK 细胞排除。和 NK 细胞相同, 小鼠 γ δ -TCR+ T 细胞能够杀死体内培养的鳞状细胞癌细胞(Squamous cell carcinoma line), 在特定情况下, RAE-1 还可引起 γ δ -TCR+ T 细胞对移植肿瘤的记忆。

在人类中也发现了 Rae-1 的同源基因, 即人 ULBP-1、-2、-3。作为人类巨细胞病毒(Cytomegalovirus, CMV)糖蛋白 UL16 的结合蛋白首先被发现, ULBP 基因和 MHC-I 家族相关, 但和同样能与 UL16 结合的 MICB 没有很近的联系。ULBP 也是 NKG2D 的配体, 能够刺激 NK 细胞表达细胞因子(cytokine)和化学因子(chemokine)。ULBP 在抗 NK 细胞的靶细胞中的表达能使其受到 NK 细胞的攻击。巨细胞病毒感染的细胞可能正是通过 UL16 蛋白遮蔽了细胞表面的 ULBP 或 MIC 抗原从而逃避免疫系统的攻击。

综上所述, 在人类和小鼠中开展的这些研究表明, 无论针对的是病毒还是肿瘤, 在 NK 细胞、 γ δ -TCR+ T 细胞、CD8+ α β -TCR+ T 细胞介导的免疫防护中, NKG2D 都起到了一个关键的作用。

90 年代以来, 肿瘤免疫学的研究取得了一些突破性进展, 肿瘤免疫治疗又进入一个新的高潮。很多免疫治疗方法已进入临床试验, 主要是通过多种方法在体内或体外训练、激活患者的免疫细胞以识别恶性细胞, 并使其大量扩增, 最终清除或抑制恶性细胞。1991 年首次发现了人类肿瘤免疫排斥抗原。以后的很多研究已证明, 大多数肿瘤细胞具有与正常细胞不同的成分, 可以引起免疫系统对之识别并攻击, 称之为肿瘤免疫排斥抗原。利用肿瘤免疫排斥抗原可以在患者体内外诱导产生出可杀伤肿瘤的免疫细胞。因此肿瘤免疫排斥抗原是肿瘤免疫治疗中最为关键的成分。

迄今为止, 已在黑色素瘤及包括前列腺癌、胸腺癌、卵巢癌、肠胃癌在内的各种肿瘤组织中发现了不少肿瘤抗原。目前已发现的人类肿瘤免疫排斥抗原可分为

四种类型。第一类抗原来自于正常基因产物的体细胞突变，第二类抗原来自于和致癌过程相关的基因突变。这两类抗原均为患者特异性抗原，不适合普遍性治疗。第三类抗原为那种在正常组织中也有表达，但在肿瘤中表达量升高的基因的产物。如果不涉及突变，这类抗原在各种癌症病人中是具有普遍性的，但它们通常是组织特异的，且并非为肿瘤所特有，在临床应用上意义不大。第四类抗原具有严格的肿瘤特异性，和一般的致癌过程相关。因此，这类抗原在人类肿瘤中广泛的表达，最适合于作为肿瘤标志物以及抗肿瘤免疫攻击的靶点。然而，目前已发现的抗原中很少是属于这一类的。

因此，本领域迫切需要开发新的第4类肿瘤免疫排斥抗原作为肿瘤标志物，用于肿瘤的诊断和治疗。

发明概述

本发明的目的是提供一种新的人肿瘤标志物 RL5 蛋白以及其片段、类似物和衍生物。

本发明的另一目的是提供编码这些多肽的多核苷酸。

本发明的另一目的是提供生产这些多肽的方法以及该多肽和编码序列的用途。本发明经过广泛而深入的研究，发现并分离出了新的可作为肿瘤标志物的抗原基因：RL5。该基因在正常组织中不表达或表达量很低，在肿瘤组织中广泛表达。其表达产物为一个分泌蛋白。RL5 能高效地与 NKG2D 受体结合。在此基础上完成了本发明。

在本发明的第一方面，提供新颖的分离出的 RL5 多肽，它包含：具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列的多肽、或其保守性变异多肽、或其活性片段、或其活性衍生物。较佳地，该多肽选自下组：(a)具有 SEQ ID NO: 2 中 1-213 位或 29-213 位氨基酸序列的多肽；(b)将 SEQ ID NO: 2 中 1-213 位或 29-213 位氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的，且具有 NKG2D 结合功能的由(a)衍生的多肽。

在本发明的第二方面，提供编码分离的这些多肽的多核苷酸，该多核苷酸包含一核苷酸序列，该核苷酸序列与选自下组的一种核苷酸序列有至少 70% 相同性：(a)编码上述人 RL5 多肽的多核苷酸；和 (b)与多核苷酸(a)互补的多核苷酸。较佳地，该多核苷酸编码具有 SEQ ID NO: 2 中 1-213 位或 29-213 位氨基酸序列的多肽。更佳地，该多核苷酸的序列是选自下组的一种：(a) 具有 SEQ ID NO: 1 中 85-639 位的序列；(b) 具有 SEQ ID NO: 1 中 1-639 位的序列；(c) 具有 SEQ ID NO: 1 中 1-720 位的序列。

在本发明的第三方面，提供了含有上述多核苷酸的载体，以及被该载体转化或转导的宿主细胞或者被上述多核苷酸直接转化或转导的宿主细胞。

在本发明的第四方面，提供了制备 RL5 蛋白的方法，该方法包含：(a)在适合

表达蛋白的条件下，培养上述被转化或转导的宿主细胞；(b)从培养物中分离出 RL5 蛋白。

在本发明的第五方面，提供了与上述的人 RL5 多肽特异性结合的抗体。还提供了可用作引物或探针的核酸分子，它含有上述的多核苷酸中连续的 15-720 个核苷酸。

在本发明的第六方面，提供了模拟、促进、拮抗人 RL5 多肽活性的化合物，以及抑制人 RL5 多肽的表达的化合物。还提供了筛选和/或制备这些化合物的方法。较佳地，该化合物是人 RL5 多肽的编码序列或其片段的反义序列。

在本发明的第七方面，提供了检测样品中是否存在 RL5 蛋白的方法，它包括：将样品与 RL5 蛋白的特异性抗体接触，观察是否形成抗体复合物，形成了抗体复合物就表示样品中存在 RL5 蛋白。还提供了一种检测肿瘤的方法，包括步骤：检测病人的样品(如血液、尿液、体液、唾液等)中是否存在 RL5 蛋白。

在本发明的第八方面，本发明还提供了一种检测肿瘤的试剂盒，它含有特异性扩增 RL5 的引物对和/或 RL5 特异性抗体。此外，还可含有特异性探针和/或 PCR 缓冲液等。

在本发明的第九方面，提供了本发明多肽和编码序列的用途。例如本发明多肽可被用于筛选促进人 RL5 多肽活性的激动剂，或者抑制人 RL5 多肽活性的拮抗剂、或者被用于肽指纹图谱鉴定。本发明的人 RL5 蛋白的编码序列或其片段，可被作为引物用于 PCR 扩增反应，或者作为探针用于杂交反应，或者用于制造基因芯片或微阵列。

在本发明的第十方面，提供了一种药物组合物，它含有安全有效量的本发明的人 RL5 拮抗剂以及药学上可接受的载体。优选的 RL5 拮抗剂是抗 RL5 的抗体和 RL5 反义序列。这些药物组合物可治疗各种肿瘤以及增强或抑制免疫力。

本发明的其它方面由于本文的技术的公开，对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

图1 是RL5的电泳图。

图2A和2B显示了ULBP-2与RL5的氨基酸序列和核苷酸序列比对。其中图2B中的阴影区为信号肽，下划线为ULBP-2的跨膜区。

图3A和2B显示了ULBP-2与RL5的跨膜区分析。

图4显示了 RL5 的分泌表达。泳道 1. 293T-RL5 的全细胞裂解物；泳道 2. 293T-RL5 的细胞上清；泳道 3. 293T-RL5 的细胞上清的免疫共沉淀产物。

图5显示了 RL5 在大肠杆菌 (DH5 α) 中的诱导表达。泳道 1 分别是分子量标准(分子量分别为 97, 66, 44, 31, 20, 14K)，泳道 2 和 4 为诱导表达后，诱导 3 和 5 为诱导表达前。箭头为 RL5 条带。

图 6 显示了纯化的 RL5 电泳图。

图 7 显示了 RL5 在多种肿瘤中的表达谱。

图 8A 和 8B 显示了 RL5 在 9 对肠道肿瘤组织中的 RT-PCR 和定量 PCR 结果。

图 9 显示了 RL5 与 NKG2D 特异性的结合

发明详述

在本发明中，术语“RL5 蛋白”、“RL5 多肽”或“肿瘤标志物 RL5”可互换使用，都指具有人肿瘤标志物 RL5 氨基酸序列 (SEQ ID NO:2) 的蛋白或多肽。它们还包括不含有信号肽 (1-28 位) 的成熟 RL5。

如本文所用，“分离的”是指物质从其原始环境中分离出来 (如果是天然的物质，原始环境即是天然环境)。如活体细胞内的天然状态下的多核苷酸和多肽是没有分离纯化的，但同样的多核苷酸或多肽如从天然状态中同存在的其他物质中分开，则为分离纯化的。

如本文所用，“分离的 RL5 蛋白或多肽”是指 RL5 多肽基本上不含天然与其相关的其它蛋白、脂类、糖类或其它物质。本领域的技术人员能用标准的蛋白质纯化技术纯化 RL5 蛋白。基本上纯的多肽在非还原聚丙烯酰胺凝胶上能产生单一的主带。

本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽、合成多肽，优选重组多肽。本发明的多肽可以是天然纯化的产物，或是化学合成的产物，或使用重组技术从原核或真核宿主 (例如，细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞) 中产生。根据重组生产方案所用的宿主，本发明的多肽可以是糖基化的，或可以是非糖基化的。本发明的多肽还可包括或不包括起始的甲硫氨酸残基。

本发明还包括人 RL5 蛋白的片段、衍生物和类似物。如本文所用，术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明的天然人 RL5 蛋白相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是 (i) 有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基 (优选保守性氨基酸残基) 被取代的多肽，而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的，或 (ii) 在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽，或 (iii) 成熟多肽与另一个化合物 (比如延长多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇) 融合所形成的多肽，或 (iv) 附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽 (如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列，或与抗原 IgG 片段的形成的融合蛋白)。根据本文的教导，这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

在本发明中，术语“人 RL5 多肽”指具有人 RL5 蛋白活性的 SEQ ID NO. 2 序列的全长多肽或成熟多肽。该术语还包括具有与人 RL5 蛋白相同功能的、SEQ ID NO. 2 序列的变异形式。这些变异形式包括 (但并不限于)：若干个 (通常为 1-50 个，较佳地 1-30 个，更佳地 1-20 个，最佳地 1-10 个) 氨基酸的缺失、插入和/或取代，

以及在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个(通常为 20 个以内, 较佳地为 10 个以内, 更佳地为 5 个以内)氨基酸。例如, 在本领域中, 用性能相近或相似的氨基酸进行取代时, 通常不会改变蛋白质的功能。又比如, 在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括人 RL5 蛋白的活性片段和活性衍生物。

该多肽的变异形式包括: 同源序列、保守性变异数体、等位变异数体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与人 RL5 DNA 杂交的 DNA 所编码的蛋白、以及利用抗人 RL5 多肽的抗血清获得的多肽或蛋白。本发明还提供了其他多肽, 如包含人 RL5 多肽或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外, 本发明还包括了人 RL5 多肽的可溶性片段。通常, 该片段具有人 RL5 多肽序列的至少约 10 个连续氨基酸, 通常至少约 30 个连续氨基酸, 较佳地至少约 50 个连续氨基酸, 更佳地至少约 80 个连续氨基酸, 最佳地至少约 100 个连续氨基酸。

发明还提供人 RL5 蛋白或多肽的类似物。这些类似物与天然人 RL5 多肽的差别可以是氨基酸序列上的差异, 也可以是不影响序列的修饰形式上的差异, 或者兼而有之。这些多肽包括天然或诱导的遗传变异数体。诱导变异数体可以通过各种技术得到, 如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变, 还可通过定点诱变法或其他已知分子生物学的技术。类似物还包括具有不同于天然 L-氨基酸的残基(如 D-氨基酸)的类似物, 以及具有非天然存在的或合成的氨基酸类似物。应理解, 本发明的多肽并不限于上述例举的代表性的多肽。

修饰(通常不改变一级结构)形式包括: 体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化, 如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽。这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸, 磷酸丝氨酸, 磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

在本发明中, “人 RL5 蛋白保守性变异数肽”指与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列相比, 有至多 10 个, 较佳地至多 8 个, 更佳地至多 5 个; 最佳地至多 3 个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异数肽最好根据表 1 进行氨基酸替换而产生。

表 1

| 最初的残基 | 代表性的取代 | 优选的取代 |
|---------|-------------------------|-------|
| Ala (A) | Val; Leu; Ile | Val |
| Arg (R) | Lys; Gln; Asn | Lys |
| Asn (N) | Gln; His; Lys; Arg | Gln |
| Asp (D) | Glu | Glu |
| Cys (C) | Ser | Ser |
| Gln (Q) | Asn | Asn |
| Glu (E) | Asp | Asp |
| Gly (G) | Pro; Ala | Ala |
| His (H) | Asn; Gln; Lys; Arg | Arg |
| Ile (I) | Leu; Val; Met; Ala; Phe | Leu |
| Leu (L) | Ile; Val; Met; Ala; Phe | Ile |
| Lys (K) | Arg; Gln; Asn | Arg |
| Met (M) | Leu; Phe; Ile | Leu |
| Phe (F) | Leu; Val; Ile; Ala; Tyr | Leu |
| Pro (P) | Ala | Ala |
| Ser (S) | Thr | Thr |
| Thr (T) | Ser | Ser |
| Trp (W) | Tyr; Phe | Tyr |
| Tyr (Y) | Trp; Phe; Thr; Ser | Phe |
| Val (V) | Ile; Leu; Met; Phe; Ala | Leu |

本发明的多核苷酸可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 形式包括 cDNA、基因组 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是单链的或是双链的。DNA 可以是编码链或非编码链。编码成熟多肽的编码区序列可以与 SEQ ID NO:1 所示的编码区序列相同或者是简并的变异数体。如本文所用，“简并的变异数体”在本发明中是指编码具有 SEQ ID NO:2 的蛋白质，但与 SEQ ID NO:1 所示的编码区序列有差别的核酸序列。

编码 RL5 的成熟多肽的多核苷酸包括：只编码成熟多肽的编码序列；成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列；成熟多肽的编码序列（和任选的附加编码序列）以及非编码序列。术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸，也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

本发明还涉及上述多核苷酸的变异数体，其编码与本发明有相同的氨基酸序列的多肽或多肽的片段、类似物和衍生物。此多核苷酸的变异数体可以是天然发生的等位变异数体或非天然发生的变异数体。这些核苷酸变异数体包括取代变异数体、缺失变异数体和插入变异数体。如本领域所知的，等位变异数体是一个多核苷酸的替换形式，它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入，但不会从实质上改变其编码多肽的功能。

本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少 50%，较佳地至少 70%，更佳地至少 80%，最佳地至少 90%或 95%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中，“严格条件”是指：(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如 0.2×SSC, 0.1%SDS, 60℃；或(2)杂交时加有变性剂，如 50%(v/v) 甲酰胺, 0.1%小牛血清/0.1% Ficoll, 42℃等；或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在 90%以上，更好是 95%以上时才发生杂交。并且，可杂交的多核苷酸编码的多肽与 SEQ ID NO:2 所示的成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

本发明还涉及与上述的序列杂交的核酸片段。如本文所用，“核酸片段”的长度至少含 15 个核苷酸，较好是至少 30 个核苷酸，更好是至少 50 个核苷酸，最好是至少 100 个核苷酸以上。核酸片段可用于核酸的扩增技术(如 PCR)以确定和/或分离编码 RL5 蛋白的多核苷酸。

本发明的人 RL5 核苷酸全长序列或其片段通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于 PCR 扩增法，可根据本发明所公开的有关核苷酸序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的 cDNA 库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板，扩增而得有关序列。当序列较长时，常常需要进行两次或多次 PCR 扩增，然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。

目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段，衍生物)的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子(或如载体)和细胞中。此外，还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

应用 PCR 技术扩增 DNA/RNA 的方法被优先用于获得本发明的基因。用于 PCR 的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择，并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的 DNA/RNA 片段。

本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体，以及用本发明的载体或 RL5 蛋白编码序列经基因工程产生的宿主细胞，以及经重组技术产生本发明所述多肽的方法。

通过常规的重组 DNA 技术，可利用本发明的多核苷酸序列可用来表达或生产重组的 RL5 多肽。一般来说有以下步骤：

- (1). 用本发明的编码人 RL5 多肽的多核苷酸(或变异体)，或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞；
- (2). 在合适的培养基中培养的宿主细胞；

(3). 从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

本发明中，人 RL5 多核苷酸序列可插入到重组表达载体中。总之，只要能在宿主体内复制和稳定，任何质粒和载体都可以用。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起点、启动子、标记基因和翻译控制元件。

本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含人 RL5 编码 DNA 序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等。所述的 DNA 序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上，以指导 mRNA 合成。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。

此外，表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因，以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状，如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以及绿色荧光蛋白 (GFP)，或用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性。

包含上述的适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的载体，可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属的细菌细胞；真菌细胞如酵母；植物细胞；果蝇 S2 或 Sf9 的昆虫细胞；CHO、COS、或 293 细胞的动物细胞等。

用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获，用 CaCl_2 法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 MgCl_2 。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的 DNA 转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析 (HPLC) 和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

重组的人 RL5 蛋白或多肽有多方面的用途。这些用途包括(但不限于)：用于筛选对抗 RL5 蛋白功能的抗体、多肽或其它物质。

另一方面，本发明还包括对人 RL5 DNA 或是其片段编码的多肽具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体，尤其是单克隆抗体。这里，“特异性”是指抗体能结

合于人 RL5 基因产物或片段。较佳地，指那些能与人 RL5 基因产物或片段结合但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体。本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。

本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体，而且还包括具有免疫活性的抗体片段，如 Fab' 或 (Fab)₂ 片段；抗体重链；抗体轻链；遗传工程改造的单链 Fv 分子；或嵌合抗体。

抗人 RL5 蛋白的抗体可用于免疫组织化学技术中，检测活检标本中的人 RL5 蛋白。

本发明抗体可用于治疗或预防人 RL5 蛋白相关疾病如肿瘤。一种方法是用巯基交联剂如 SPDP，攻击抗体的氨基，通过二硫键的交换，将毒素结合于抗体上，这种杂交抗体可用于杀灭人 RL5 蛋白阳性的细胞，如肿瘤细胞。

利用本发明蛋白，通过各种常规筛选方法，可筛选出与 RL5 蛋白发生相互作用的物质，如受体、抑制剂、激动剂或拮抗剂等。

本发明蛋白及其抗体、抑制剂、激动剂、拮抗剂或受体等，当在治疗上进行施用(给药)时，可提供不同的效果。通常，可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中，其中 pH 通常约为 5-8，较佳地 pH 约为 6-8，尽管 pH 值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药，其中包括(但并不限于)：肌内、腹膜内、静脉内、皮下、皮内、或局部给药。

RL5 拮抗剂(如抗体和反义序列)可直接用于疾病治疗，例如，用于治疗肿瘤，包括(但并不限于)胃癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌、肝癌、前列腺癌、白血病等。此外，RL5 拮抗剂还可联用其他治疗剂，如 TNF- α 、TNF- β 等。

本发明还提供了一种药物组合物，它含有安全有效量的本发明 RL5 拮抗剂以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于)：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式，例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。诸如片剂和胶囊之类的药物组合物，可通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量，例如每天约 1 微克-10 毫克/千克体重。

本发明还涉及定量和定位检测人 RL5 蛋白水平的诊断试验方法。这些试验是本领域所熟知的，且包括 FISH 测定和放射免疫测定。试验中所检测的人 RL5 蛋白水平，可以用于诊断肿瘤。

一种检测样品中是否存在 RL5 蛋白的方法是利用 RL5 蛋白的特异性抗体进行检测，它包括：将样品与 RL5 蛋白特异性抗体接触；观察是否形成抗体复合物，形成了抗体复合物就表示样品中存在 RL5 蛋白。

RL5 蛋白的多核苷酸可用于 RL5 蛋白相关疾病的诊断和治疗。本发明的多核苷

酸的一部分或全部可作为探针固定在微阵列或 DNA 芯片上，用于分析组织中基因的差异表达分析和基因诊断。用 RL5 蛋白特异的引物进行 RNA-聚合酶链反应 (RT-PCR) 体外扩增也可检测 RL5 蛋白的转录产物。

本发明还提供了一种检测肿瘤的试剂盒，它含有特异性扩增 RL5 的引物对和/或 RL5 特异性抗体。此外，还可含有特异性探针和/或 PCR 缓冲液等。

对 RL5 的测序结果表明，它和 ULBP-1, -2 和 -3 三个基因的有一定同源性，尤其与 ULBP-2 的同源性最高(约 80%)。表达分析结果表明，RL5 基因仅在肿瘤组织中表达，在正常细胞中不表达或表达量很低。此外，感兴趣的是，RL5 是分泌蛋白，可分泌到体液中。因此，RL5 是一个有效的肿瘤标志物，在众多的癌症的诊断和治疗中发挥作用。

鉴于 RL5 可能是一个肿瘤细胞特有的免疫排斥性抗原，分泌到体液中。因此，血样或尿液中的 RL5 的直接测定除了可以作为肿瘤的辅助诊断和愈后的观察指标之外，也可作为肿瘤早期诊断的依据。

除了作为诊断手段，RL5 在肿瘤的外科手术上也有很大的应用价值，有助于确定肿瘤的浸润的深度，具体边缘及隐藏的部分。放射免疫指导外科 (radioimmunoguided surgery, RIGS) 是将标记放射性同位素标记的肿瘤相关抗原的抗体，注射到体内进行显像分析，它可以准确定位肿瘤浸润的范围。

在肿瘤的免疫治疗方面，RL5 或 RL5 的融合蛋白可用作免疫刺激因子，与位于 NK 细胞、 $\gamma\delta$ -TCR+ T 细胞、CD8+ $\alpha\beta$ -TCR+ T 细胞表面的 NKG2D 受体结合，激活这些细胞的活性，释放出细胞毒素并杀死肿瘤细胞，同时扩增这类抗肿瘤细胞在体内的数量，达到增强免疫力的效果。在肿瘤疫苗方面，RL5 可用于制备分子瘤苗。肿瘤疫苗是主动免疫的主要内容，分为细胞瘤苗、亚细胞瘤苗、分子瘤苗和基因瘤苗四种类型。前二者为早期的肿瘤疫苗，临床效果参差不齐，远期疗效多数不理想。分子瘤苗是根据抗体与抗原的作用关系，制备抗肿瘤原独特型的抗体，作为独特型瘤苗，在临幊上也见到一定疗效。肿瘤抗原肽可以产业化生产，不会有肿瘤种植的危险，不存在肿瘤细胞的抑制成分。用 RL5 作为肿瘤抗原肽，得到的分子疫苗不受 MHC 限制，且可以应用于多种肿瘤。除了分子瘤苗外，把 RL5 基因串联在一起插入病毒载体作为基因瘤苗也是一种较好的瘤苗方式。

此外，RL5 可用于增强或抑制免疫力。由于本发明的 RL5 多肽及其衍生物等可与人体重要的刺激性免疫受体 NKG2D 受体结合，具有免疫刺激或抑制的作用，因此可用于治疗自身免疫疾病、免疫排斥等其它领域。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆实验室手册 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

实施例 1、RL5 基因的获得：

在 ULBP3 基因深入研究时，设计了如下引物，以用常规方法构建的人类淋巴细胞株 Jurkat cDNA 文库为模板，通过常规 PCR 方法进行扩增，结果如图 1。

上游引物：5'cggaattcatggcagcgccgcagcccc 3'(SEQ ID NO: 3)

下游引物：5'gccaaaggatgcccaggaggatgaagca 3'(SEQ ID NO: 4)

从图 1 中结果看出，利用该对引物 PCR 扩增获得了多个条带，其中主带片段大小约为 700bp。将此片段回收、克隆入载体后测序得到 720bp 的序列 (SEQ ID NO: 1)。分析后发现这段序列并非 ULBP3 序列而是一个新基因，将其命名为 RL5。

实施例 2、RL5 序列分析和定位

实施例 1 获得 720bp 的序列 (SEQ ID NO: 1) 中包含 RL5 基因的完整编码区，其 ORF 位于第 1-639 位，编码一个 213 氨基酸的蛋白质 (SEQ ID NO: 2)。根据 RL5 的 EST 信息，将其定位于染色体 6q25.1。

将 RL5 的编码区与 ULBP 家族其他成员 (ULBP1-4) 进行同源比对 (核酸水平)，结果如下：

| Seq-> | ulbp1 | ulbp2 | ulbp3 | ulbp4 | RL5 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ulbp1 | 1.000 | 0.715 | 0.334 | 0.385 | 0.678 |
| ulbp2 | — | 1.000 | 0.311 | 0.387 | 0.811 |
| ulbp3 | — | — | 1.000 | 0.261 | 0.284 |
| ulbp4 | — | — | — | 1.000 | 0.339 |
| RL5 | — | — | — | — | 1.000 |

结果显示 RL5 与 ULBP2 的同源性最高，达到 81%。软件分析显示 RL5 和 ULBP2 的核苷酸序列的 1—631 位的同源性高达 94%，在 3' 端 RL5 提前终止 (图 2B)。

对 RL5 的跨膜结构分析结果显示 (图 3)，RL5 所缺少的这段序列恰好为跨膜结构域的编码区，这提示 RL5 是一个分泌型的抗原蛋白。此外，对该蛋白序列进行信号肽分析，发现其 1-28 位为信号肽，由其 DNA 序列的第 1-84 个碱基所编码。

如图 2A 和 2B 所示，除 3' 端跨膜区外，RL5 和 ULBP2 的差异主要集中于此 5' 端的信号肽编码区，也就是说，RL5 和 ULBP2 基因所编码的蛋白的膜外区域几乎完全相同。

实施例 3、RL5 的表达研究

在实施例 2 中，利用软件分析，推测 RL5 可能是一个分泌蛋白。为了证实这个假设，构建 RL5 C-末端带有 FLAG 表位标记的真核融合表达载体 pCDEF3-RL5-FLAG，转染 293T 细胞，24 小时后收集细胞和上清。将细胞裂解处理，上清用

anti-FLAG M2 免疫共沉淀。在此之后，用 anti-FLAG M2 抗体分别对细胞裂解物、上清、上清的免疫共沉淀产物进行免疫蛋白印迹分析。

结果如图 4 所示。可看出，RL5-FLAG 蛋白绝大多数存在于上清的免疫共沉淀产物中，因此，RL5 确实是一个分泌型的蛋白。

实施例 4、RL5 蛋白重组表达和纯化：

在该实施例中，以实施例 1 中的 PCR 扩增产物为模板，用序列如下的 5' 和 3' 端的 PCR 寡核苷酸引物进行扩增，获得人 RL5 DNA 作为插入片段。

PCR 反应中使用的 5' 端寡核苷酸引物序列为：

5'ccggaaattcGACCTCACTCTTTGCTATGACA 3' (SEQ ID NO: 5)

该引物含有 EcoRI 限制性内切酶的酶切位点，在该酶切位点之后是不含信号肽序列的部分编码序列；

3'端引物序列为：

5'gccaaagcttgcgtccaggaggatgaagca 3' (SEQ ID NO:6)

该引物含有 HindIII 限制性内切酶的酶切位点、翻译终止子和人 RL5 的部分编码序列。

人 RL5 蛋白 cDNA PCR 产物纯化后经 EcoRI, HindIII 双酶切再与质粒 pProEXHTa(GIBCOBRL 公司)按常规方法重组形成载体 pProEXHTa-RL5 并转化至感受态大肠杆菌 DH5 α ，挑取阳性克隆鉴定后纯化并测序(ABI 公司的 377 型测序仪，BigDye Terminator 试剂盒，PE 公司)。经测序证实，已插入了完整的 RL5 编码序列。

挑表达 RL5 的阳性 DH5 α 克隆接种于 10ml LB 培养基中，37°C 300rpm 振荡培养过夜，1:100 稀释于接种于 LB 培养基振荡培养 2.5hr，加 100mM IPTG 至 0.1mM 后 37°C 诱导 2-3hr。为了检测诱导效果，将诱导后的菌液裂解后直接走蛋白电泳，结果如图 5。从图中可以看出，诱导前和诱导后，RL5 蛋白的表达量有很大的区别，说明 RL5 的诱导表达是成功的。

用以下方法进行 RL5 蛋白的纯化：诱导后的菌液以 5,000g 4°C 离心 10min 去上清，置冰上用 50ml 上样缓冲液 (0.5M NaCl, 20mM 咪唑 2.7 mM KCl, 10.1mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, pH8.0) 重悬，超声(B. Braun Labsonic U)破碎，然后 12,000g 4 离心 10min, 上清用 0.8μm 滤膜过滤后，过 1ml Ni²⁺ metal chelating Sepharose 4B 层析柱，上样缓冲液充分洗涤后，加入 500ul 咪唑洗脱缓冲液 (0.5M NaCl, 500mM 咪唑 2.7 mM KCl, 10.1mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, pH8.0) 室温静置 30 分钟后收集洗脱液，重复洗脱 2-3 次，得到人 RL5 蛋白(图 6)。

实施例 5、RL5 的组织表达谱

用如下 RL5 编码区内部引物，通过 RT-PCR 法，分析 RL5 在多种肿瘤组织和正

常组织中的表达情况：

上游：5' ATGGCAGCGGCCGAGCCCC 3' (SEQ ID NO:7)

下游：5' TCAGATGCCAGGGAGGATGAAGCA 3' (SEQ ID NO:8)

结果如图 7 所示。以管家基因 GAPDH 作为正对照，利用 RT-PCR 方法在多种肿瘤组织中均可获得明显的阳性片段，其正常组织对照中则没有扩增片段，或扩增片段条带明显弱于肿瘤组织中的条带。这些结果显示，在这些肿瘤组织中，如胃癌、结肠癌、乳腺癌、肾癌等，RL5 基因有表达，而在正常组织中不表达或表达量很低。

实施例 6、RL5 基因的两个亚型的发现

在实施例 5 中，对 RL5 的表达情况进行了探讨。值得注意的是，从图 7 还可以看出一个有趣的现象，所有的阳性片段均为两条条带。将此二者分别回收，克隆测序后发现，小片段的序列与实施例 1 所克隆的 RL5 基因一致，而大片段的序列则多了 100 个碱基，为 RL5 基因的另一种亚型，其序列如 SEQ ID NO:9 所示。

实施例 7、RL5 基因的表达定量

为了进一步确定 RL5 基因在各种肿瘤组织中的表达情况，共选取了 9 对肠道肿瘤的肿瘤组织及其正常组织对照，编号为 1N, 1T; 2N, 2T; ... 9N, 9T；其中 N 代表正常组织，T 代表肿瘤组织。利用 RT-PCR、实时荧光定量 PCR 技术，集中于肠道肿瘤组织进行定性、定量的研究。

| 组织 | 肠组织样品对 | RL5 变化倍数(肿瘤 vs. 正常) |
|------|--------|---------------------|
| 直肠 | 1N-1T | 3.43 |
| 直肠 | 2N-2T | 8.49 |
| 右半结肠 | 3N-3T | 3.43 |
| 升结肠 | 4N-4T | 2.48 |
| 直肠 | 5N-5T | 5.34 |
| 乙状结肠 | 6N-6T | 18.57 |
| 乙状结肠 | 7N-7T | 44.18 |
| 结肠 | 8N-8T | 2.48 |
| 末端回肠 | 9N-9T | 5.91 |

RT-PCR 结果(图 8A)中可以看出，部分肿瘤组织与其相应的正常组织相比，RL5 的表达量有所提高，而其余的几对组织则相反或观察不到条带。

定量 PCR 的结果显示(图 8B)，在所有九对组织中，RL5 在肿瘤组织中的表达量都要高于其对应的正常组织，最高可达正常组织表达量的 44 倍。

实施例 8、RL-5 与 NKG2D 结合

用含有 NKG2D 的逆转录病毒表达载体转染小鼠 Ba/F3 细胞株，使其表面表达 NKG2D 受体。用 293T 细胞转染 pCDEF3-RL5 及对照质粒 pCDEF3，24 小时后收集细胞上清。由于 RL5 为分泌型蛋白，获得含有 RL5 蛋白的上清及不含 RL5 蛋白的对照上清。将转染 NKG2D 的 Ba/F3 细胞分别与 293T-pCDEF3-RL5 上清(含 RL5)和 293T-pCDEF3(不含 RL5)预孵育(室温，1 小时)后，PBS 洗三遍，重悬于 100 μ l 的 PBS。用以下方法进行标记，通过流式细胞仪，免疫荧光发标记。

| | 细胞 | 一抗 | 二抗 |
|---|----------------------------|------------|----------------|
| A | Ba/F3-NKG-2D | 对照抗体 | 山羊-抗-mIgG-FITC |
| B | Ba/F3-NKG-2D | Anti-NKG2D | 山羊-抗-mIgG-FITC |
| C | Ba/F3-NKG-2D 与 RL5-上清孵育后重悬 | Anti-NKG2D | 山羊-抗-mIgG-FITC |
| D | Ba/F3-NKG-2D 与对照上清孵育后重悬 | Anti-NKG2D | 山羊-抗-mIgG-FITC |

从图 9 中可见，对照抗体与 Ba/F3-NKG2D 不结合(A)，而 NKG2D 抗体能够和 Ba/F3-NKG2D 结合(B)，显示 NKG2D 受体确实表达在 Ba/F3 细胞表面了。将 Ba/F3-NKG-2D 与 RL5-上清孵育后重悬，在用 NKG2D 抗体标记，结果显示没有结合(C)，而对照实验中，Ba/F3-NKG-2D 与对照上清孵育后重悬，用 NKG2D 抗体标记，结果显示 NKG2D 能够和其抗体结合(D)。图 9E 是图 9A—D 的重叠图。这说明 RL5 是 NKG2D 的配体，它与 Ba/F3 表面的 NKG2D 受体结合，从而阻断了 NKG2D 与其抗体的结合。对照试验中，没有 RL5 蛋白，故而无法阻断 NKG2D 与其抗体的结合。

实施例 9、抗 RL5 蛋白抗体的产生

将实施例 4 中获得的重组人 RL5 蛋白用来免疫动物以产生抗体，具体方法如下。重组分子用层析法进行分离后备用。也可用 SDS-PAGE 凝胶电泳法进行分离，将电泳条带从凝胶中切下，并用等体积的完全 Freund's 佐剂乳化。用 50-100 μ g/0.2ml 乳化过的蛋白，对小鼠进行腹膜内注射。14 天后，用非完全 Freund's 佐剂乳化的同样抗原，对小鼠以 50-100 μ g/0.2ml 的剂量进行腹膜内注射以加强免疫。每隔 14 天进行一次加强免疫，至少进行三次。获得的抗血清的特异反应活性用它在体外沉淀人 RL5 蛋白基因翻译产物的能力加以评估。结果发现，抗体可特异性地与本发明蛋白发生结合。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权利要求

1. 一种分离的人RL5多肽，其特征在于，它包含：具有SEQ ID NO: 2氨基酸序列的多肽、或其保守性变异多肽、或其活性片段、或其活性衍生物。
2. 如权利要求1所述的多肽，其特征在于，该多肽选自下组：
 - (a) 具有SEQ ID NO: 2中1-213位或29-213位氨基酸序列的多肽；
 - (b) 将SEQ ID NO: 2中1-213位或29-213位氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的，且具有NKG2D结合功能的由(a)衍生的多肽。
3. 一种分离的多核苷酸，其特征在于，它包含一核苷酸序列，该核苷酸序列与选自下组的一种核苷酸序列有至少70%相同性：
 - (a) 编码如权利要求1和2所述多肽的多核苷酸；
 - (b) 与多核苷酸(a)互补的多核苷酸。
4. 如权利要求3所述的多核苷酸，其特征在于，该多核苷酸编码具有SEQ ID NO: 2中1-213位或29-213位氨基酸序列的多肽。
5. 如权利要求3所述的多核苷酸，其特征在于，该多核苷酸的序列选自下组的一种：
 - (a) 具有SEQ ID NO: 1中85-639位的序列；
 - (b) 具有SEQ ID NO: 1中1-639位的序列；
 - (c) 具有SEQ ID NO: 1中1-720位的序列。
6. 一种载体，其特征在于，它含有权利要求3所述的多核苷酸。
7. 一种遗传工程化的宿主细胞，其特征在于，它含有权利要求6所述的载体。
8. 一种RL5蛋白的制备方法，其特征在于，该方法包含：
 - (a) 在适合表达的条件下，培养权利要求7所述的宿主细胞；
 - (b) 从培养物中分离出RL5蛋白。
9. 一种能与权利要求1所述的RL5蛋白特异性结合的抗体。
10. 一种检测样品中是否存在RL5蛋白的方法，其特征在于，包括：
将样品与RL5蛋白特异性结合的抗体接触，观察是否形成抗体复合物，形成了抗体复合物就表示样品中存在RL5蛋白。

说 明 书 附 图

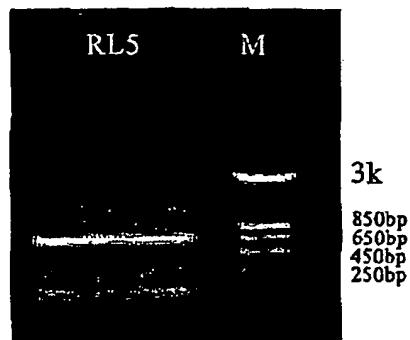


图 1

| | | | | | | |
|-------|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| u1bp2 | MAAAATKIL ECEPELILSST GWSRAAGRDP HSLCYDITVI PKFRPGPRNC AVQGQVDEKT | | | | | |
| r15 | MAAAASPAKE LRLPULLILSST SWORTGELADP HSLCYDITVI PKFRPGPRNC AVQGQVDEKT | | | | | |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| u1bp2 | FLHYDCGNKT VTPVSPLGKK LNVTTARKAQ NPVLREVVDI LTEQLRDIQL ENYTPKEPLT | | | | | |
| r15 | FLHYDCGSKT VTPVSPLGKK LNVTTARKAQ NPVLREVVDI LTEQLLDIQL ENYIPKEPLT | | | | | |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| u1bp2 | LOARMSCEQK AEQHSSGSWQ FSFDGQIFLL FDSEKRMMTT VHPGARKMKKE KWENDKVVAN | | | | | |
| r15 | LOARMSCEQK AEQHSSGSWQ LSFDGQIFLL FDSENRMWTT VHPGARKMKKE KWENDKDMTN | | | | | |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| u1bp2 | SFHYFSMDC IGMLEDFLIG MDSTLEPSAG APLAMSSGTT QLRATATTLI LCCLLIIILPC | | | | | |
| r15 | SFHYISMDC TGMLEDFLIG MDSTLEPSAG ————— GIV | | | | | |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | |

u1bp2 FILPGI

r15

图 2A

Ulbp2: 1 atggcagcagccgcgtaccaagatccctctgtgcctccgcctctgtgcctgtgtcc 60
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 r15: 1 atggcagcagccgcgtacccgcgttcccttaacgcctccgcctctgtgcctgtgtcc 60
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 ulbp2: 61 ggctggtcccggtgtggcgagccgaccctcactctcttgcgtatgacatcacccgtcata 120
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 r15: 61 agctggtcaggacccgggtggccgaccctcactctcttgcgtatgacatcacccgtcata 120
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 ulbp2: 121 cctaagttcagacactggaccacgggtgggtgcgttcaaggcagggtggatgaaaagact 180
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 RL5: 121 cctaagttcagacactggaccacgggtgggtgcgttcaaggcagggtggatgaaaagact 180
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Ulbp2: 181 tttttcactatgactgtggcaacaagacagtacacactgtcagtccctggggaaagaaa 240
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 RL5: 181 tttttcactatgactgtggcagcaagacagtacacccgtcagtccctggggaaagaaa 240
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Ulbp2: 241 ctaaatgtcacaacggcctggaaagcacagaacccagttactgagagaggtggacata 300
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 RL5: 241 ctaaatgtcacaacggcctggaaagcacagaacccagttactgagagaggtggacata 300
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Ulbp2: 301 cttacagagcaactgcgtacatttcgtggagaattacacaccccaaggaaacccctcacc 360
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 RL5: 301 cttacagagcaactgcgttgcacatttcgtggagaattacacaccccaaggaaacccctcacc 360
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Ulbp2: 361 ctgcaggcaaggatgtttgtggcggaaaagctgtggatcttggcag 420
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 RL5: 361 ctgcaggccaggatgtttgtggcggaaaagccggcaggacacccggcgtggatcttggcag 420
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Ulbp2: 421 ttcatgtggcggatcttccctctttgtactcagaaatgtggacaacg 480
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 RL5: 421 ttcatgtggcggatcttccctctttgtactcagaaatgtggacaacg 480
 ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Ulbp2: 481 gttcatctggggcggaaaatgtggaaaatgtggaaaatgtggacaacg 540
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 RL5: 481 gttcatctggggcggaaaatgtggaaaatgtggaaaatgtggacaacg 540
 ||||| ||||| ||||| |||||
 Ulbp2: 541 tcctccattacttcataatggggactgtataggatggcgttggacttggatggc 600
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 RL5: 541 tcctccattacatcataatggggactgtgcacaggatggcgttggacttggatggc 600
 ||||| ||||| ||||| |||||
 Ulbp2: 601 atggacagcacccctggggcggaaaatgtggggactgtggggcacaacc 660
 ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 RL5: 601 atggacagcacccctggggcggaaaatgtggggcacaaccatgtggatggc 660
 ||||| |||||
 Ulbp2: 661 caactcaggcccacagccaccacccatcatttgcgtgcctccatcatccctccctgc 720
 RL5: _____
 Ulbp2: 721 ttcatcctccctggcgtatgt
 RL5: _____

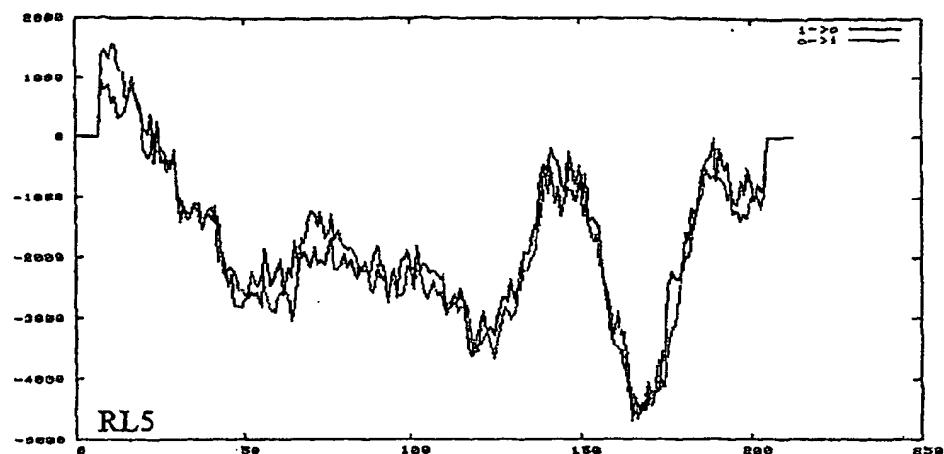


图 3A

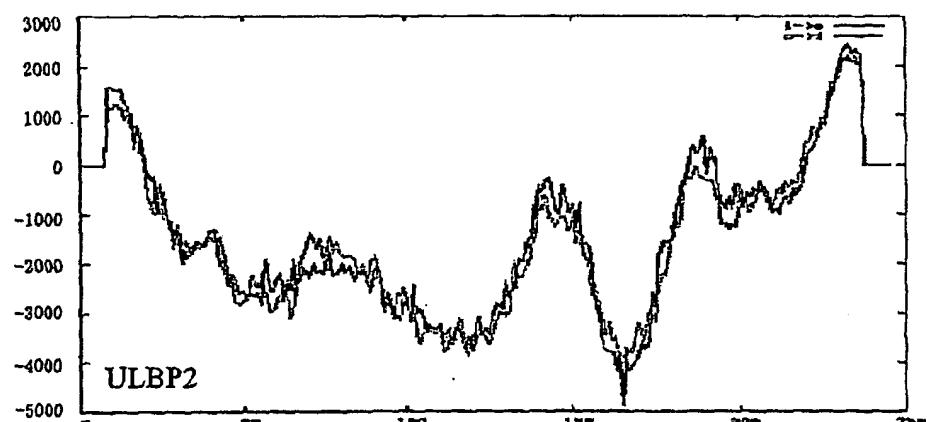


图 3B

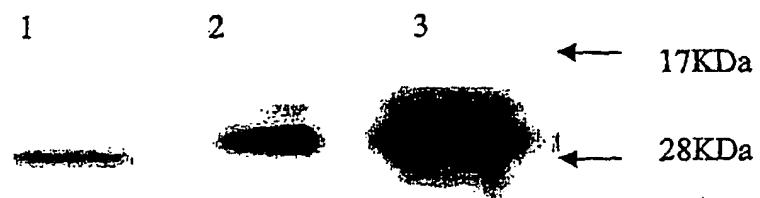


图 4

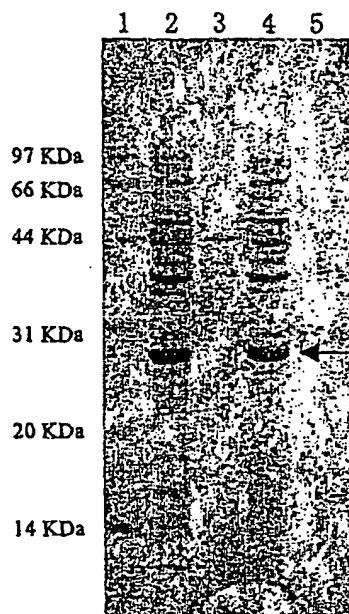


图 5

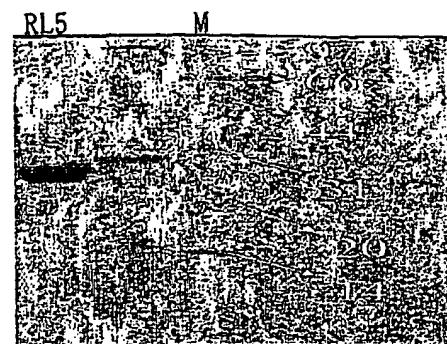
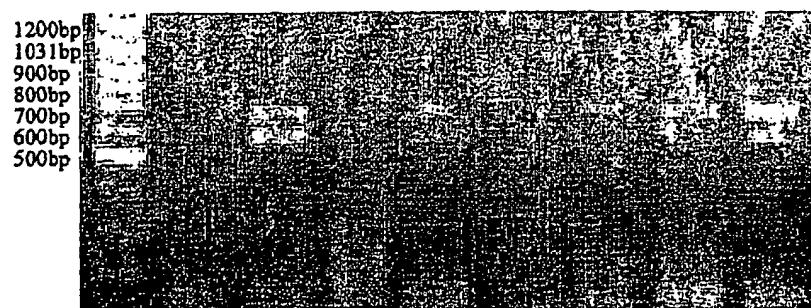


图 6

RL5 胃 胃癌 结肠 结肠癌 乳腺 乳癌 肾 肾癌



GAPDH

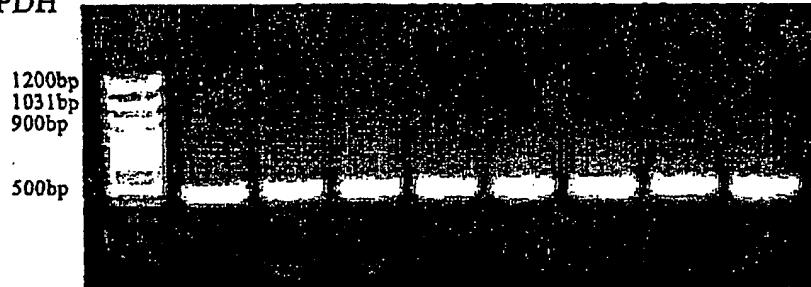


图 7

RT-PCR

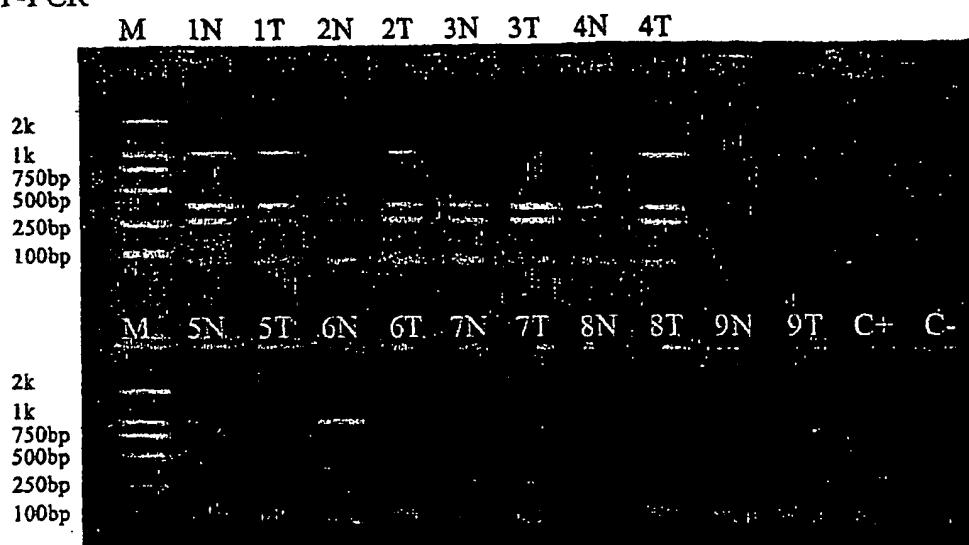


图 8A

在肿瘤组织中
RL5 表达量的
变化倍数

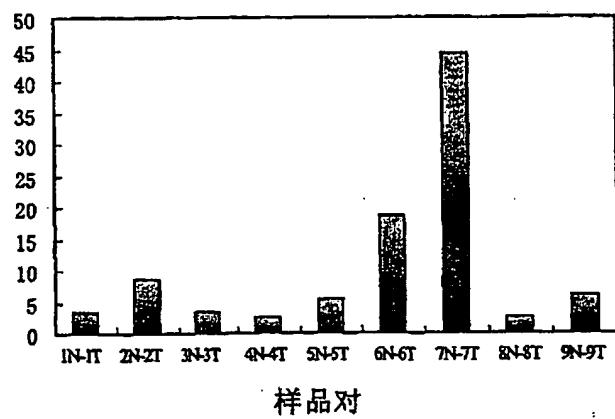


图 8B

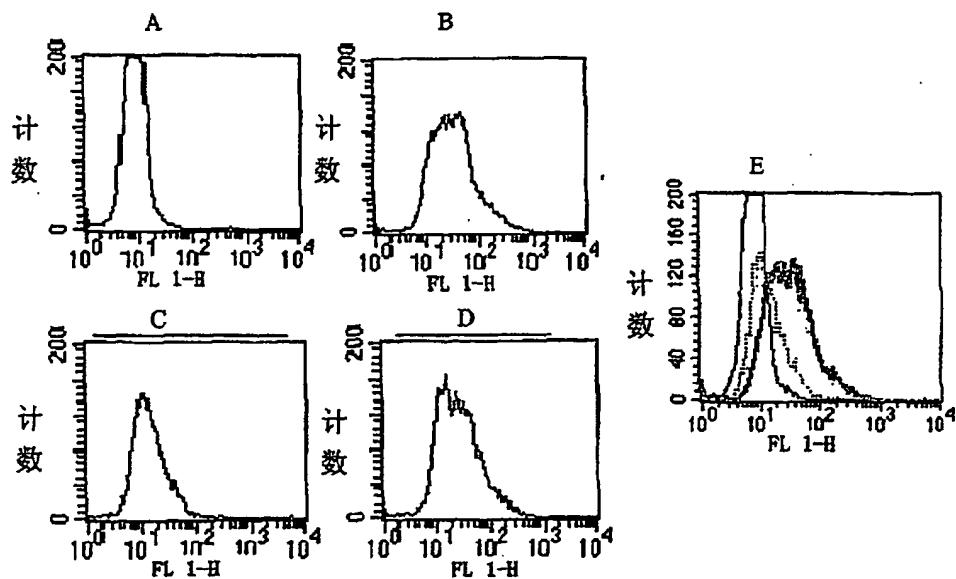


图 9

序列表

<110> 吴, 翟
罗, 潘

<120> 肿瘤标志物及其用途

<130> 024455

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 720

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(639)

<223>

<400> 1

| | |
|---|----|
| atg gca gcg gcc agc ccc gcg ttc ctt cta cgc ctc ccg ctt ctg | 48 |
| Met Ala Ala Ala Ala Ser Pro Ala Phe Leu Leu Arg Leu Pro Leu Leu | |
| 1 5 10 15 | |

| | |
|---|----|
| ctc ctg ctg tcc agc tgg tgc agg acc ggg ctg gcc gac cct cac tct | 96 |
| Leu Leu Leu Ser Ser Trp Cys Arg Thr Gly Leu Ala Asp Pro His Ser | |
| 20 25 30 | |

| | |
|---|-----|
| ctt tgc tat gac atc acc gtc atc cct aag ttc aga cct gga cca cgg | 144 |
| Leu Cys Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg Pro Gly Pro Arg | |
| 35 40 45 | |

| | |
|---|-----|
| tgg tgt gcg gtt caa ggc cag gtg gat gaa aag act ttt ctt cac tat | 192 |
| Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys Thr Phe Leu His Tyr | |
| 50 55 60 | |

| | |
|---|-----|
| gac tgt ggc agc aag aca gtc aca ccc gtc agt ccc ctg ggg aag aaa | 240 |
| Asp Cys Gly Ser Lys Thr Val Thr Pro Val Ser Pro Leu Gly Lys Lys | |
| 65 70 75 80 | |

| | |
|---|-----|
| cta aat gtc aca acg gcc tgg aaa gca cag aac cca gta ctg aga gag | 288 |
| Leu Asn Val Thr Ala Trp Lys Ala Gln Asn Pro Val Leu Arg Glu | |
| 85 90 95 | |

| | |
|---|-----|
| gtg gtg gac ata ctt aca gag caa ctg ctt gac att cag ctg gag aat | 336 |
| Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Leu Asp Ile Gln Leu Glu Asn | |
| 100 105 110 | |

| | |
|---|-----|
| tac ata ccc aag gaa ccc ctc acc ctg cag gcc agg atg tct tgt gag | 384 |
| Tyr Ile Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys Glu | |
| 115 120 125 | |

| | |
|---|-----|
| cag aaa gcc gaa gga cac ggc agt gga tct tgg cag ctc agt ttc gat | 432 |
| Gln Lys Ala Glu Gly His Gly Ser Gly Ser Trp Gln Leu Ser Phe Asp | |
| 130 135 140 | |

| | |
|---|-----|
| gga cag atc ttc ctc ctc ttt gac tca gaa aac aga atg tgg aca acg | 480 |
| Gly Gln Ile Phe Leu Leu Phe Asp Ser Glu Asn Arg Met Trp Thr Thr | |
| 145 150 155 160 | |

| | |
|---|-----|
| gtt cat cct gga gcc aga aag atg aaa gaa aag tgg gag aat gac aag | 528 |
| Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys Glu Lys Trp Glu Asn Asp Lys | |
| 165 170 175 | |

| | |
|--|-----|
| gat atg acc atg tcc ttc cat tac atc tca atg gga gac tgc aca gga | 576 |
| Asp Met Thr Met Ser Phe His Tyr Ile Ser Met Gly Asp Cys Thr Gly | |
| 180 185 190 | |
| tgg ctt gag gac ttc ttg atg ggc atg gac acc ctg gag cca agt | 624 |
| Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser Thr Leu Glu Pro Ser | |
| 195 200 205 | |
| gca gga ggc aca gtc tgacccaaag ccatggccac caccctcagt ccctgccagcc | 679 |
| Ala Gly Gly Thr Val | |
| 210 | |
| tcctccat cctccctgc ttcatccctcc ctggcatctg a | 720 |
| <210> 2 | |
| <211> 213 | |
| <212> PRT | |
| <213> 智人(Homo sapiens) | |
| <400> 2 | |
| Met Ala Ala Ala Ala Ser Pro Ala Phe Leu Leu Arg Leu Pro Leu Leu | |
| 1 5 10 15 | |
| Leu Leu Leu Ser Ser Trp Cys Arg Thr Gly Leu Ala Asp Pro His Ser | |
| 20 25 30 | |
| Leu Cys Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg Pro Gly Pro Arg | |
| 35 40 45 | |
| Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys Thr Phe Leu His Tyr | |
| 50 55 60 | |
| Asp Cys Gly Ser Lys Thr Val Thr Pro Val Ser Pro Leu Gly Lys Lys | |
| 65 70 75 80 | |
| Leu Asn Val Thr Thr Ala Trp Lys Ala Gln Asn Pro Val Leu Arg Glu | |
| 85 90 95 | |
| Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Leu Asp Ile Gln Leu Glu Asn | |
| 100 105 110 | |
| Tyr Ile Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys Glu | |
| 115 120 125 | |
| Gln Lys Ala Glu Gly His Gly Ser Gly Ser Trp Gln Leu Ser Phe Asp | |
| 130 135 140 | |
| Gly Gln Ile Phe Leu Leu Phe Asp Ser Glu Asn Arg Met Trp Thr Thr | |
| 145 150 155 160 | |
| Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys Glu Lys Trp Glu Asn Asp Lys | |
| 165 170 175 | |
| Asp Met Thr Met Ser Phe His Tyr Ile Ser Met Gly Asp Cys Thr Gly | |
| 180 185 190 | |
| Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser Thr Leu Glu Pro Ser | |
| 195 200 205 | |

Ala Gly Gly Thr Val
210

<210> 3
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 3
cggaattcat ggcaagcgcc gccagcccc

29

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 4
gccaagcttg atgccaggga ggatgaagca

30

<210> 5
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 5
ccgaaattcg accctcaactc tctttgctat gaca

34

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 6
gccaagcttg atgccaggga ggatgaagca

30

<210> 7
<211> 21
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 引物

<400> 7

atggcagcgg ccggccagccc c

21

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 引物

<400> 8

tcagatgcca gggaggatga agca

24

<210> 9

<211> 742

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 9

| | | | |
|--------------------------|------------------------|---------------------------|-----|
| atggcagcgg ccggccagccc c | cgcggttcctt ctacgcctcc | cggttctgtgt cctgtgtcc | 60 |
| acgtggtgca ggaccgggtt | ggccgaccctt cactctttt | gtatgacat caaccgtatc | 120 |
| cctaaggtaa gacctggacc | acgggtgggtt | gcccccaag gccagggtgg | 180 |
| tttcttcaact atgactgtgg | cagcaagaca gtcacacccg | tcgtccctt gggaaagaaa | 240 |
| ctaaatgtca caacggcctg | gaaagcacag aaccctgtac | tgagagaggt ggtggacata | 300 |
| cttacagacg aactgttga | cattcagctg gagaattaca | tacccaaagg acccctcacc | 360 |
| ctggcaggcca ggatgtcttg | tgagcagaaa gccgaaggac | acggcagtgg atcttggcag | 420 |
| ctcagtttcg atggacagat | tttacttcctc | tttacttcctc aaaaacagaat | 480 |
| gttcatccctg gagccagaaa | gatgaaagaa | atggacaaacgtt gttcatccctg | 540 |
| tcccttcatt acatctcaat | aaatgggaga | atgacaagga tatgaccat | 600 |
| atggacacca ccctggagcc | aagtgcagga | gttcatccctg tcccttcatt | 660 |
| caacccaggg ccacggccac | gcaccaccca | gttcatccctg tcccttcatt | 720 |
| atatgctccaa ggcacagtct | ccatgtcctc | gttcatccctg tcccttcatt | 742 |
| ga | | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN02/00631

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

C07K14/435 C12N15/12

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

GenBank

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT WPI(TUMOR/TAG/MARKER/LABEL/MHC)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | Immunity 14 (2), 123-133 (2001), Cosman,D et al, ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor | 1,3,6-7 |

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27.MAR2003 (27.03.03)

Date of mailing of the international search report

10 APR 2003 (10.04.03)

Authorized officer

JIA

Telephone No. 86-10-62093933

Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China
Facsimile No. 86-10-62019451

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN02/00631

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | Genomics 79 (1), 114-123 (2002), Radosavljevic, M. et al., A cluster of ten novel MHC class I related genes on. human chromosome 6q24.2-q25.3 | 1,3,6-8 |
| A | GenBank BC034689 1368 bp mRNA linear PRI 16-AUG-2002 Homo sapiens, UL16 binding protein 2, clone MGC:21383 IMAGE:4747126, mRNA, complete cds. | 4 |
| A | WO9819167(SPIES THOMAS(US) SPIES VERONIKA(US) HUTCHINSON FRED CANCER RES(US)) 07MAY1998 (07.05.1998) CELL STRESS REGULATED HUMAN MHC CLASS I GENE | 1-10 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN02/00631

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| wo9819167 | 1998-05-07 | EP0937258A | 1999-08-25 |

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

| | | | |
|--|--|--|--|
| (51) International Patent Classification⁶ : G01N 33/574, C12N 5/06, A61K 48/00, C12Q 1/68, C12N 5/08, C07K 16/28 | | A2 | (11) International Publication Number: WO 98/19167 (43) International Publication Date: 7 May 1998 (07.05.98) |
| (21) International Application Number: PCT/US97/20170 | | (81) Designated States: CA, JP, US, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). | |
| (22) International Filing Date: 29 October 1997 (29.10.97) | | Published <i>Without international search report and to be republished upon receipt of that report.</i> | |
| (30) Priority Data: 60/029,044 29 October 1996 (29.10.96) US | | | |
| (71) Applicant (for all designated States except US): FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER, INC. [US/US]; 1100 Fairview Avenue North, Mail Stop C2M-027, Seattle, WA 98109 (US). | | | |
| (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): SPIES, Thomas [DE/US]; 2429 E. Aloha, Seattle, WA 98112 (US). SPIES, Veronika [AT/US]; 2429 E. Aloha, Seattle, WA 98112 (US). | | | |
| (74) Agent: HIGHLANDER, Steven, L.; Arnold, White & Durkee, P.O. Box 4433, Houston, TX 77210 (US). | | | |
| (54) Title: CELL STRESS REGULATED HUMAN MHC CLASS I GENE | | | |
| (57) Abstract <p>The present invention provides various methods by which the use of certain MHC-related molecules can be exploited in understanding and regulating the immune response. More particularly, the present invention describes the use of molecules expressed by certain cell types as markers, reagents and targets in the diagnosis and treatment of certain disease states including GVHD, cancer and the like.</p> | | | |

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

| | | | | | | | |
|----|--------------------------|----|---------------------------------------|----|---|----|--------------------------|
| AL | Albania | ES | Spain | LS | Lesotho | SI | Slovenia |
| AM | Armenia | FI | Finland | LT | Lithuania | SK | Slovakia |
| AT | Austria | FR | France | LU | Luxembourg | SN | Senegal |
| AU | Australia | GA | Gabon | LV | Latvia | SZ | Swaziland |
| AZ | Azerbaijan | GB | United Kingdom | MC | Monaco | TD | Chad |
| BA | Bosnia and Herzegovina | GE | Georgia | MD | Republic of Moldova | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagascar | TJ | Tajikistan |
| BE | Belgium | GN | Guinea | MK | The former Yugoslav Republic of Macedonia | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Greece | ML | Mali | TR | Turkey |
| BG | Bulgaria | HU | Hungary | MN | Mongolia | TT | Trinidad and Tobago |
| BJ | Benin | IE | Ireland | MR | Mauritania | UA | Ukraine |
| BR | Brazil | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Iceland | MX | Mexico | US | United States of America |
| CA | Canada | IT | Italy | NE | Niger | UZ | Uzbekistan |
| CF | Central African Republic | JP | Japan | NL | Netherlands | VN | Viet Nam |
| CG | Congo | KE | Kenya | NO | Norway | YU | Yugoslavia |
| CH | Switzerland | KG | Kyrgyzstan | NZ | New Zealand | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Democratic People's Republic of Korea | PL | Poland | | |
| CM | Cameroon | KR | Republic of Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kazakhstan | RO | Romania | | |
| CU | Cuba | LC | Saint Lucia | RU | Russian Federation | | |
| CZ | Czech Republic | LJ | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Germany | LK | Sri Lanka | SE | Sweden | | |
| DK | Denmark | LR | Liberia | SG | Singapore | | |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.